

Aus dem Institut de Médecine et de Chirurgie expérimentales, Université de Montréal  
Montréal, Canada

## Verhütung der experimentellen Calcinosis cutis durch Aminoazetonitril (AAN)\*

Von

HANS SELYE, MARC CANTIN\*\* und PIERRE JEAN\*\*

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. August 1960)

Kurz nach Entdeckung des D-Vitamins unternahm der eine von uns systematische Studien über die durch bestrahltes Ergosterin im Tierkörper erzeugbare Calcinosis universalis. Unser Hauptinteresse galt damals der Verkalkung der inneren Organe sowie den Veränderungen am Skelet junger Ratten, deren Mütter mit D-Vitaminpräparaten überdosiert wurden. Als Nebebefund beobachteten wir jedoch bei diesen Versuchen, daß die Haut neugeborener Tiere, die durch die Muttermilch toxische Mengen von D-vitaminartigen Stoffen erhielten, ganz besonders trocken und straff wurde<sup>4,6</sup>.

Etwas später hatten wir Gelegenheit, einen Kranken zu beobachten, der an einer anscheinend durch ein Nebenschilddrüsenadenom bedingten allgemeinen Calcinoase gestorben ist<sup>5</sup>. Die Organveränderungen bei diesem Patienten sahen denen der experimentellen D-Hypervitaminose außerordentlich ähnlich. Kurz darauf sahen wir, daß man bei jungen Ratten mit hohen Dosen von Nebenschilddrüsenhormon eine ziemlich selektive Hautverkalkung hervorrufen kann, die die verkalkende Sklerodermie (die „sclérodémie calcaire“ der französischen Autoren) nachahmte<sup>7,8</sup>. Dieselbe Hautlesion konnte dann später mit dem D-Vitamininderivat Dihydrotachysterin (DHT) erzeugt werden<sup>9</sup>. Es gelang jedoch, sowohl mit Nebenschilddrüsenhormon als auch mit DHT eine derartige experimentelle Calcinosis cutis nur bei neugeborenen Ratten hervorzurufen und selbst bei diesen nur an gewissen Predilektionsstellen, besonders über dem Schädeldach und zwischen den Schultern. Außerdem riefen selbst tödliche Dosen dieser Substanzen nicht in jedem Falle

---

\* Diese Arbeit wurde mit Hilfe der „Gustavus and Louise Pfeiffer Research Foundation“ und der „U.S. Army Medical Research and Development Command, Office of the Surgeon General, Contract No. DA-49-193-MD-2039“ ausgeführt. Das Aminoazetonitril wurde uns von den Abbott Laboratories, das Dihydrotachysterin („Calceamin“) von der Firma Dr. Wander A.G. in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt.

\*\* Fellows of the Quebec Heart Foundation, Inc.

Hautveränderungen hervor. Aus diesen Gründen war unser experimentelles Krankheitsmodell nicht besonders dazu geeignet, die Faktoren, die bei der Calcinosis cutis (und eventuell auch bei der Sklerodermie) eine prädisponierende oder heilende Rolle haben könnten, zu erforschen.

Nichtsdestoweniger wurden unsere Versuche von verschiedenen Autoren und zwar auch an anderen Tierarten (Schweinen, Meerschweinchen) wiederholt und bestätigt, ja sie veranlaßten sogar mehrere Chirurgen — besonders LERICHE u. Mitarb.<sup>1-3</sup> — dazu, partielle Nebenschilddrüsenexstirpationen zur Behandlung der Sklerodermie auszuführen. Obwohl diese Operationen zwar keineswegs immer erfolgreich waren, sah man bei manchen Sklerodermiekranken doch bemerkenswerte, wenn auch nur vorübergehende Besserungen, so daß weitere Versuche unternommen wurden, um das experimentelle Modell der Krankheit besser auszuarbeiten. Es sei dahingestellt, ob die experimentelle Calcinosis cutis mit der „sclérodémie calcaire“ identisch ist, doch hofften wir, auf diese Weise der Pathogenese derartiger Dermatosen näherzukommen.

In Fortführung dieser Untersuchungen stellte sich dann heraus, daß man bei mit DHT-behandelten Ratten durch lokale Traumatisierung innerer Organe in diesen eine mehr oder weniger selektive Kalkablagerung hervorrufen kann<sup>10</sup>. Da sich die klinische Sklerodermie auch manchmal selektiv an durch lokales Trauma geschädigten Hautregionen ausbildet<sup>8</sup>, war es für uns von ganz besonderem Interesse, feststellen zu können, daß man bei der mit relativ schwachen peroralen Dosen von DHT sensibilisierten Ratte durch milde Hautschädigung (z. B. Ausrupfen der Haare) an beliebiger Stelle Calcinosis cutis erzeugen kann<sup>13</sup>. Dieses Verfahren der peroralen DHT-Behandlung kombiniert mit lokalem Hauttrauma stellte einen für uns wichtigen methodologischen Fortschritt dar, da es die Erzeugung von Calcinosis cutis an beliebiger Stelle und zwar nicht nur bei neugeborenen, sondern auch bei erwachsenen Ratten mit Sicherheit und ohne Mortalität ermöglichte. Mit Hilfe dieser Technik konnten wir dann auch verschiedene Fragen bezüglich der Histogenese dieser Dermatoase ausarbeiten<sup>14</sup>.

Der Hauptzweck eines experimentellen Krankheitsmodells ist natürlich, daß es die Erforschung etwaiger Heilmittel erleichtern kann. In früheren Untersuchungen über die Wirkungen der sogenannten lathyrogenen Amine wurde festgestellt, daß diese Körper nicht nur eine entzündungswidrige Wirkung haben<sup>11</sup>, sondern auch im allgemeinen auf Bindegewebsstrukturen und ganz besonders selektiv auf das kalkreiche Knochengewebe destruktiv einwirken<sup>12</sup>. Es lag daher an der Hand, zu untersuchen, ob man mit lathyrogenen Aminen die durch DHT bedingte Calcinosis cutis günstig beeinflussen könnte.

### Material und Methodik

Als Versuchstiere benutzten wir 40 weibliche Sprague-Dawley-Ratten des Holtzmanstammes mit einem durchschnittlichen Anfangsgewicht von 99 g (95 bis 105 g), die in vier Gruppen von je zehn Tieren eingeteilt wurden. Zur Erzeugung der Hautverkalkung bekamen die Tiere aller vier Gruppen täglich 150  $\mu$ g DHT (Dihydrotachysterin, „Calcamin“ Wander) in 0,5 cm<sup>3</sup> Maisöl durch die Schlundsonde vom 1. bis zum 4. Versuchstage. Nach dieser viertägigen sensibilisierenden Vorbehandlung wurde, ebenfalls bei den Tieren aller vier Gruppen, das Fell im Bereiche zweier rundlicher Hautregionen, je mit einem Durchmesser von etwa 2 cm, über dem Scheitel und in der Lumbalregion gerupft. Vorversuche hatten gezeigt, daß die Haut des Scheitels für die Erzeugung einer DHT-bedingten Verkalkung viel empfindlicher ist als die der Lendengegend, so daß wir durch diesen Doppeltest eine bessere Abschätzung der etwaigen therapeutischen Wirkung des Lathyrogens erzielen wollten.

Als lathyrogenen Körper benutzten wir das Aminoacetonitril (AAN), von dem jede Einzeldosis in 2 cm<sup>3</sup> Wasser ebenfalls durch die Schlundsonde peroral verabreicht wurde. Weitere Vorversuche hatten gezeigt, daß die anticaleinotische Wirkung des AAN bei derartigen Versuchen am stärksten ist, wenn man das Mittel nicht als Vorbehandlung mit dem DHT, sondern erst zur Zeit des Hauttraumas, dann aber als „Stoßtherapie“ in hohen Dosen, verabreicht.

*Gruppe 1* diente als Kontrolle und wurde nicht mit AAN behandelt.

*Gruppe 2* bekam 40 mg AAN einmal täglich vom 4. bis zum 6. Versuchstage.

*Gruppe 3* erhielt bloß eine einzige Gabe von 100 mg AAN am 4. Versuchstage.

*Gruppe 4* erhielt zweimal 100 mg (9 Uhr und 16 Uhr) ebenfalls am 4. Tage.

Bei den Tieren, die positiv reagierten, waren die Hautveränderungen schon am 6. und 7. Tage (d. h. 2–3 Tage nach dem Hauttrauma) makroskopisch ganz evident. Um jedoch die Vortäuschung einer prophylaktischen Wirkung, etwa bedingt durch eine bloße Verspätung in der Ausbildung der Hautlesionen, auszuschließen, beendeten wir den Versuch erst am 11. Tage, d. h. eine Woche nach Unterbrechung der DHT-Behandlung. Zu dieser Zeit entwickelten sich in unseren Vorversuchen niemals mehr neue Verkalkungsherde.

Die Intensität aller Hautlesionen wurde im Sinne einer willkürlichen Skala von 0–3 (0 = keine Veränderung, 1 = gerade wahrnehmbare Hautlesion, 2 = mittelschwere Hautlesion und 3 = schwerste Hautlesion mit Exulceration und Ausstoßung großer Kalkplatten) am 11. Tage am lebenden Tiere geschätzt. Sofort nachher wurden die Ratten aller vier Gruppen mit Chloroform getötet und die gerupften Hautregionen teils in Alkoholformol zur Kalkfärbung nach von Kossa oder mit „Celestine Blue“<sup>14</sup> und teils in mit Pikrinsäure gesättigter Susa-Lösung für die PAS-Färbung fixiert.

### Ergebnisse

Bei allen Tieren der nicht mit AAN behandelten Kontrollgruppe 1 wurde die Haut am 6. oder 7. Tage in beiden epilierten Regionen besonders dick, steif und trocken. Im Laufe der nachfolgenden Tage bildeten sich an diesen Stellen harte Platten aus, die gegen Ende des Versuches nach Exulceration teilweise abgestoßen wurden. Der Mittelwert dieser Veränderungen war am 11. Tage im Sinne unserer Skala 2,2 ( $\pm 0,20$ ). In der Scheitelregion bildeten sich die Veränderungen etwas schneller und stärker aus als in der Lendenregion, aber angesichts der außerordentlich hohen Mengen von DHT, die wir in diesen Versuchen

benutzten, waren beide epilierte Stellen nahezu maximal verkalkt. Demgegenüber sahen wir bei den drei mit AAN behandelten Gruppen fast überhaupt keine Hautveränderungen. Im Sinne unserer Skala fanden wir bei Gruppe 2 den Mittelwert von 0,4 ( $\pm 0,27$ ), bei Gruppe 3 von 0,2 ( $\pm 0,19$ ), während in Gruppe 4 bloß ein einziges Tier in der Scheitelregion eine gerade noch nachweisbare, punktförmige Verkalkung aufwies.

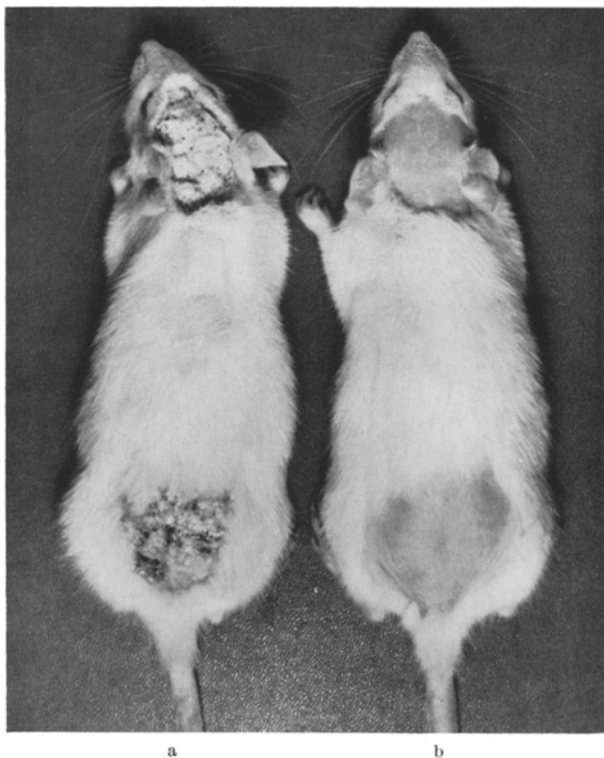


Abb. 1. a Typische Calcinosis cutis an den epilierten Hautstellen der Scheitel- und Lendengegend bei einer Ratte der Gruppe 1; b Abwesenheit jeglicher Verkalkungen bei einer mit AAN prophylaktisch behandelten Ratte der Gruppe 4

Histologisch sahen wir bei allen positiv reagierenden Tieren die übliche Kalkablagerung mit entzündlich proliferativer Reaktion in allen Schichten der Cutis, oft bis tief in die Subcutis hinabreichend (Abb. 1, 2). Demgegenüber waren bei den drei mit AAN behandelten Gruppen auch histologisch keine oder fast keine Veränderungen feststellbar. Bloß bei den wenigen Ratten, bei denen makroskopisch Läsionen zu sehen waren, konnten wir diese auch histologisch erfassen. Merkwürdigerweise war jedoch sogar in diesen Fällen die Kalkablagerung außerordentlich

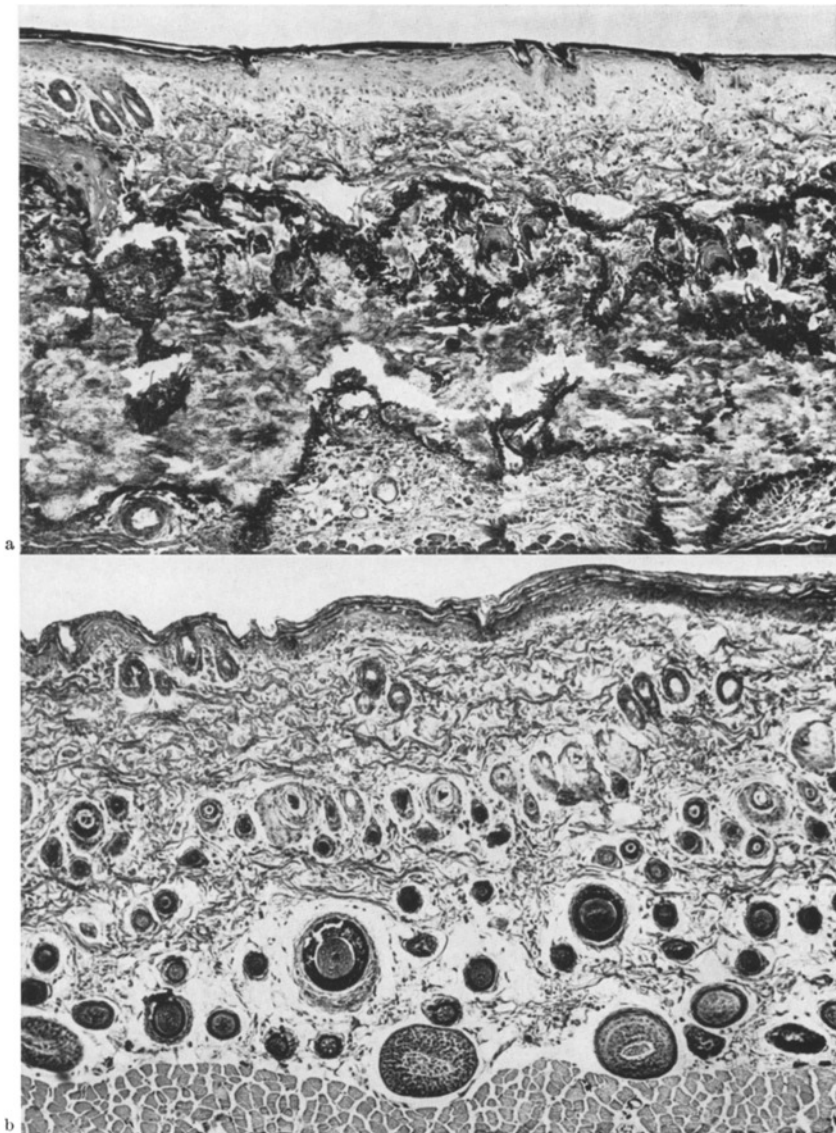


Abb.2. a Histologisches Bild der Calcinosis cutis bei einer Ratte der Gruppe 1. In diesem Präparat sieht man, daß die Randzone der Verkalkung selektiv in der für „Celestine Blue“ charakteristischen Weise gefärbt ist. Mit der von Kossa-Methode sind ähnliche Verkalkungsherde überall gleichmäßig gefärbt (Celestine Blue, Vergrößerung 120mal); b Entsprechende Hautregionen eines Tieres der Gruppe 4, bei dem die Ausbildung der Calcinose durch AAN völlig unterdrückt wurde (Celestine Blue, Vergrößerung 120mal)

schwach, selbst wenn sich eine gewisse entzündliche Reaktion in der Haut ausbildete.

Es sei nebenbei bemerkt, daß auch die Verkalkung der Arterien und besonders der Aorta, die sich unter dem Einfluß hoher Dosen von DHT-Präparaten normalerweise entwickelt, durch die AAN-Behandlung fast vollkommen verhindert wurde. Die Wirkung von AAN auf verschiedene andere Typen von Herz- und Gefäßverkalkungen liegt nicht im Rahmen dieser Untersuchungen, und unsere einschlägigen Beobachtungen sollen später an anderer Stelle veröffentlicht werden.

### Zusammenfassung

Es gelingt bei der Ratte, nach Sensibilisierung mit peroraler Zufuhr von Dihydratichysterin (DHT) durch eine leichte Hautschädigung (Ausrupfen des Felles) an einer beliebigen Stelle eine lokale Verkalkung mit Bindegewebsreaktion auszulösen. Die so erzeugten Veränderungen sehen in mancher Beziehung der verkalkenden Sklerodermie („sclérodermie calcaire“ der französischen Dermatologen) ähnlich; es bleibt jedoch einstweilen dahingestellt, ob sie mit ihr identisch oder sogar grundsätzlich verwandt sind.

Die auf diese Weise erzeugten Hautveränderungen können durch Verabreichung des lathyrogenen Körpers Aminoacetonitril (AAN) verhindert werden.

### Literatur

- <sup>1</sup> LERICHE, R., et R. JUNG: Recherche sur la nature de la sclérodermie. Les traductions tissulaires de l'hyperparathyroidisme dans la sclérodermie. Presse méd. **43**, 1361 (1935).
- <sup>2</sup> LERICHE, R., R. JUNG and M. M. DE BAKEY: The surgical treatment of scleroderma. Rationale of sympathectomy and parathyroidectomy. Surgery **1**, 6 (1937).
- <sup>3</sup> LERICHE, R., R. JUNG et C. SUREYYA: La peau dans l'hyperparathyroidisme expérimental. Etude de la sclérodermie expérimentale. Presse méd. **43**, 777 (1935).
- <sup>4</sup> SELYE, H.: Morphologische Studie über die Veränderungen nach Verfütterung von bestrahltem Ergosterin (Vigantol) bei der weißen Ratte. Krankheitsforsch. **7**, 289 (1928).
- <sup>5</sup> SELYE, H.: Zur Kenntnis der Kalkgicht (M. B. SCHMIDT) an Hand eines selbstbeobachteten Falles. Med. Klin. **10**, 379 (1929).
- <sup>6</sup> SELYE, H.: Knochenveränderungen bei den Jungen Vigantol-behandelter Tiere (Verein deutscher Ärzte in Prag, 26. Oktober 1928). Med. Klin. **24**, 167 (1929).
- <sup>7</sup> SELYE, H.: A condition simulating human scleroderma in rats injected with parathyroid hormone. J. Amer. med. Ass. **99**, 108 (1932).
- <sup>8</sup> SELYE, H.: Die Sklerodermie und ihre Entstehungsweise. Virchows Arch. path. Anat. **286**, 91 (1932).

- <sup>9</sup> SELYE, H.: Experimental production of cutaneous calcinosis and sclerosis with dihydrotachysterol (DHT). *J. invest. Derm.* **29**, 9 (1957).
- <sup>10</sup> SELYE, H.: Über den Einfluß lokaler Faktoren bei der Entstehung von Nierensteinen und Gewebsverkalkungen. *Z. Urol.* **50**, 440 (1957).
- <sup>11</sup> SELYE, H.: On the anti-inflammatory action of aminoacetonitrile (AAN). *Canad. J. Biochem.* **35**, 1029 (1957).
- <sup>12</sup> SELYE, H.: Lathyrism. *Rev. canad. Biol.* **16**, 1 (1957).
- <sup>13</sup> SELYE, H., P. JEAN and R. VEILLEUX: Role of local trauma in the production of cutaneous calcinosis by dihydrotachysterol. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **104**, 409 (1960).
- <sup>14</sup> SELYE, H., and K. NIELSEN: Histogenesis of experimental cutaneous calcinosis. *Acta morph. Acad. Sci. hung.* (im Druck) (1960).

Dr. HANS SELYE,  
Institut de Médecine et de Chirurgie expérimentales, Université de Montréal,  
Montréal (Canada)